

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 145 701**

⑫ Número de solicitud: 009800668

⑬ Int. Cl.⁷: C07C 39/07
B09B 3/00

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **30.03.1998**⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2000**Fecha de concesión: **19.12.2000**⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2001**⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.02.2001⑲ Titular/es: **Consejo Superior
de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**⑳ Inventor/es: **Fernández-Bolaños Guzmán, Juan;
Heredia Moreno, Antonia;
Felizón Becerra, Blanca;
Brenes Balbuena, Manuel;
Guillén Bejarano, Rafael y
Rodríguez Arcos, Rocío**㉑ Agente: **No consta**㉒ Título: **Procedimiento de obtención de hidroxitirosol a partir de hueso de aceituna.**

㉓ Resumen:

Procedimiento de obtención de hidroxitirosol a partir
de hueso de aceituna.Se ha identificado y cuantificado hidroxitirosol en-
tre los componentes fenólicos del hueso de aceituna.
Para ello, se ha sometido el hueso a un proceso de
autohidrólisis rápida, en un reactor de autohidrólisis.
Dicho aparato consta, además del reactor propia-
mente dicho, de una caldera de alimentación de va-
por de agua y de un depósito donde se expande el
material explosionado. Una vez realizado el trata-
miento al vapor, se lleva a cabo un fraccionamiento
del material explotado con el fin de separar los prin-
cipales constituyentes por solubilización selectiva.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 – 28036 Madrid

ES 2 145 701 B1

DESCRIPCION

Título

Procedimiento de obtención de hidroxitirosol a partir de hueso de aceituna.

Sector de la técnica

La patente está dirigida al sector de la alimentación. Se trata de un antioxidante natural de alto valor, para ser utilizado en la conservación de alimentos.

Estado de la técnica

Los huesos de aceitunas son un importante subproducto lignocelulósico de las industrias de elaboración de aceitunas de mesa. Si se tiene en cuenta que solo en España se producen al año más de $2 \cdot 10^5$ toneladas de aceitunas de mesa, de las que el 70-75 % se utilizan como deshuesadas, y que el hueso constituye el 20 % del peso total de la aceituna, se pueden disponer anualmente de 25 a 30 millones de Kg. de huesos de aceitunas. A estas cantidades se les pueden adicionar las de huesos procedentes de los nuevos procesos de extracción de aceite de oliva, que utilizan aceitunas deshuesadas y sin piel (Amirante, P., Baccione, L., Bellomo, F y Di Renzo, G.C. 1987. *Olivae* 17:24-29), que están siendo utilizados a nivel industrial por alguna Cooperativa andaluza.

En la literatura científica son relativamente escasos los trabajos relativos al hueso de aceitunas. Se han realizado estudios sobre su grasa (Mingo, M. y Romero, J.M. 1953. *Rev. de la Real Acad. de Cienc. Ex. Fis. y Nat.* 47: 553-585), proteínas (Fernández Díez, M.J. 1961. *Grasas y Aceites* 12: 67-72), azúcares, polioles y oligosacáridos (Rivas, M. 1983. *Grasas y Aceites* 34:13-16), fibra (Heredia, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J. y Rivas, M. 1987. *Biomass* 14: 143-148 y Heredia, A., Guillén, R y Pereda, J. 1988. *Anales de Química* 84: 65-69), glucósidos fenólicos (Maestro-Durán, R., León-Cabello, R. Ruíz-Gutiérrez, V. Fiestas, P y Vázquez-Roncero, A. 1994 *Grasas y Aceites* 45: 332-335) y unas investigaciones recientes sobre el aislamiento y caracterización de polisacáridos (Coimbra, M.A., Waldron, K.W. y Selvendran, R.R. 1995. *Carbohydrate Polymers* 27: 285-294).

Estos subproductos lignocelulósicos son normalmente utilizados como combustible y también más recientemente, en la fabricación de carbón activo González, M.T. Molina-Sabio, M. y Rodríguez-Reinoso, F. 1994. *Carbón* 32: 1407-1413). El procedimiento de autohidrólisis rápida o "explosión al vapor", que hoy en día es reconocido como uno de los pretratamientos más económico efectivos entre los distintos métodos que se utilizan sobre maderas duras o residuos agrícolas Duff, S.J.B y Murray, W.D. 1996. *Biores. Technol.* 55: 1-33 y Vlasenko, E., Yu. Dirg. H. Labavitch, J.M. y Shoemaker, S.P. 1997. *Biores. Technol.* 59: 109-119), podría ser una vía alternativa y rentable para el aprovechamiento de los huesos de aceituna. Con este pretratamiento se consigue separar los principales compuestos de la biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosas y lignina) y convertirlos en sustratos utilizables.

La explosión al vapor es un procedimiento de autohidrólisis que combina métodos físicos y químicos. Consiste en someter el material a al-

tas temperaturas por inyección de vapor de agua a presión, durante un corto periodo de tiempo y llevarlo de nuevo a presión normal, con lo que tiene lugar una descompresión explosiva del producto. Algunos grupos acetilos presentes en las hemicelulosas son hidrolizados produciendo ácido acético que, a las elevadas temperaturas del proceso, cataliza la hidrólisis de las hemicelulosas (autohidrólisis) para dar oligosacáridos solubles en agua. En el transcurso del tratamiento los enlaces lignina-hidratos de carbono, que aseguran la cohesión, también se destruye en parte. La lignina es parcialmente fundida y despolimerizada formando gotas al enfriarse, siendo fácil su posterior extracción. Debido a la expansión brutal del vapor en el momento de la descompresión el material es desfibrilado y reducido a partículas pequeñas. En estas condiciones el material sufre modificaciones químicas importantes y una destructuración física que facilita la posterior accesibilidad de los enzimas o microorganismos (Doraldson, L.A, Wong, K.K.Y. y Mackie, K.L. 1988. *Wood Sci. Technol.* 22: 103-114; Castro, F.B., Hotten, P.M., Orskov, E.R. y Rebeller, M. 1994. *Biores. Technol.* 50: 25-30 y Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Szengyel, Z., Zacchi, G. y Réczey, K. 1997. *Enzyme and Microbial Technol.* 20: 286-293).

El fraccionamiento que tiene lugar después del tratamiento al vapor, consigue separar los tres principales polímeros del material lignocelulósico. Como ya se ha indicado, la temperatura y la presión del agua alteran profundamente la cohesión inter e intrafibrilar y de esta forma son responsables del hinchamiento y accesibilidad para los reactivos utilizados en el fraccionamiento (Chornet, E. y Overend, R.P. 1988. "Le fractionnement des matières lignocellulosiques". Centre Québécois de valorisation de la biomasse. Québec.). Una vez las muestras desfibriladas, es posible separarlas en los principales constituyentes mediante una solubilización selectiva.

Durante el tratamiento al vapor, la fracción de hemicelulosas es continuamente autohidrolizada y la lignina parcialmente despolimerizada, dando azúcares y compuestos fenólicos solubles en agua. Entre los compuestos fenólicos presentes en la fracción acuosa de diversos materiales lignocelulósicos sometidos al tratamiento de explosión al vapor (madera de álamo, residuos de mazorca de maíz, etc.), destacan los ácidos vainílico, siringico, p-cumárico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, además de vainillina, siringaldheído y alcohol coniferílico (Ando, S., Arai, Y., Koichi, K y Hanai, S. 1986. *J. Ferment. Technol.* 64: 567-570 y Marchal, R., Ropars, M., Pourquié, J. Fayole, F. y Vandecasteele, J. P. 1992. *Biores. Technol.* 42: 205-217).

Todos los ácidos fenólicos citados son monofenoles con cierta actividad antioxidante, siendo este efecto superior en aquellos que poseen un grupo de ácido cinámico (grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$) respecto a los que tienen un grupo del ácido berizoico (grupo COOH) es decir, los ácidos p-cumárico y ferúlicos son más activos que los p-hidroxibenzoico, vainílico y siringico, respectivamente (Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F. y Shukla, V.K.S. 1997. *Food Rev. Int.* 13: 225-

292). La introducción de un segundo grupo hidroxilo en posición orto o para, incrementa notablemente la actividad antioxidante de la molécula.

Los compuestos fenólicos de la pulpa de aceitunas han sido extensamente investigados, dado su importancia en el procesado de los frutos (p.e. eliminación del sabor amargo desarrollo del color negro etc.), siendo la oleuropeína el glucósido más abundante, constituido por el éster heterosídico del ácido elenólico e hidroxitirosol, responsable de su sabor amargo. También están presentes, el ligustrósido (glucosa-ácido y elenólico-trosol) y el verbascósido (ácido cafeico-glucosa-ramnosa)-hidroxitirosol). En la semilla, los glucósidos descritos son semejantes a los anteriores y del tipo ligustrósido, de los que forma parte el tirosol en lugar del hidroxitirosol (Maestro-Durán, R., León-Cabello, R. Ruíz-Gutiérrez, V. Fiestas, P y Vázquez-Roncero, A. 1994 Grasas y Aceites 45: 332-335); (Vázquez-Roncero, A., Gracian-Constante, E. y Maestro-Durán, R. 1974. Grasas y Aceites 25: 269-279 y Fleune A., Macheix, J.J., Andary, C. y Villemur, P. 1984. L. Cr. Acad. Sci. 7: 253-256).

En el aceite de oliva además de varios ácidos fenólicos (ácidos p-cumárico, sirínico, vainílico, fenólico cafeico, p-hidroxibenzoico) Nergiz, C. y Unal, K. 1991, Food Chem. 39: 237-242) y ácidos p-hidroxifenilacético y homovainílico (Akasbi, M., Snoeman D.W. y Saari, A. 1993. J. Am Oil Chem. Soc. 70: 367-372), destacan a presencia de tirosol, hidroxitirosol un isómero del aglicón de la oleuropeína y un importante número de ésteres y glicósidos no identificados (Montedoro, G.F., Servili, M., Baldioli, M. y Miniati, E. 1992. J. Agric. Food Chem. 40: 1571-1576 y Montedoro, G.F., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E. y Macchion, A. 1993. J. Agric. Food Chem. 41: 2228-2234), siendo el o-difenol hidroxitirosol el principal responsable de la estabilidad de los aceites que lo contiene (Baldioli, M., Servili, M. Perretti, G. y Montedoro, G.F. 1996. J. Am Oil Chem. Soc. 73: 1589-1593. Puede llegar a sustituir al butilhidroxitoueno (BHT) o a su homólogo el butilhidroxianisol (BHA), principales antioxidantes de síntesis que se utilizan cuando se requiere que sean solubles en grasa, cuyo uso ha sido regulado y restringido en muchos países. En estudios recientes además, se ha demostrado que el hidroxitirosol se comporta en aceites refinados como el BHT, mejor que el BHA y que DL- α -tocoferol, a las concentraciones permitidas (Le Tutour, B. y Guecon, D. 1992. Phytochem. 31: 1173-1177 y Pat. española (Universidad de Granada) ES-2051238).

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La novedad de esta invención reside en que por primera vez se descubre, identifica y cuantifica hidroxitirosol en el hueso de aceituna, no encontrándose dicho compuesto en otros materiales lignocelulósicos según se desprende de la literatura científica. Es igualmente novedoso el utilizar un sistema de autohidrólisis rápida para desestructurar el hueso y permitir la obtención de hidroxitirosol, antioxidante natural de notable valor en la industria de la alimentación.

Descripción detallada de la invención

Se ha identificado y cuantificado hidroxitirosol entre los componentes fenólicos del hueso de aceituna. Este compuesto no está descrito en ningún otro material lignocelulósico.

Para ello, se ha sometido el hueso a un proceso de autohidrólisis rápida, en un reactor de autohidrólisis. Dicho aparato consta, además del reactor propiamente dicho, de una caldera de alimentación de vapor de agua y de un depósito donde se expande el material explosionado. Para lograr una mayor efectividad, el hueso sin triturar se impregna previamente con ácido sulfúrico diluido, se introduce en el reactor y se somete a altas temperaturas por inyección de vapor de agua a presión, durante un corto periodo de tiempo y se lleva de nuevo a presión normal, con lo que ocurre una descompresión explosiva. Los tiempos de residencia se sitúan en torno a 2 minutos y la temperatura oscila entre 200 y 235°C.

Una vez realizado el tratamiento al vapor, se lleva a cabo un fraccionamiento del material explotado con el fin de separar los principales constituyentes por solubilización selectiva, según se indica en el esquema de la figura 1. Como resultado de la explosión se obtiene una fracción insoluble (fundamentalmente lignina y celulosa) y otra soluble que contiene la mayor parte de las hemicelulosas y fenoles de bajo peso molecular, procedentes fundamentalmente de la despolimerización de la lignina (vainillina, ácidos sirínico y vainílico, etc.).

Los fenoles se extraen con acetato de etilo a partir de la fracción soluble. Entre los identificados en el extracto se ha encontrado el *hidroxitirosol*. Dicha identificación se lleva a cabo -tras su separación por HPLC- por espectroscopía de UV, comparando los tiempos de retención y los espectros de absorción (200-400 nm) con patrones conocidos. La posterior cuantificación se realiza respecto a una curva patrón de hidroxitirosol. De esta forma se ha llegado a un rendimiento superior al 0.1 %.

La obtención en estado puro, podría hacerse por algunos de los procedimientos usuales descritos en la bibliografía, tales como HPLC preparativa, extracción líquido-líquido en contracorriente, etc.

El aumento de hidroxitirosol obtenido a partir del hueso de aceituna, a medida que se incrementan las condiciones de severidad del tratamiento de autohidrólisis (aumento a la temperatura, tiempo de residencia en el reactor o utilización de un catalizador, por impregnación con ácido diluido), sugiere que este compuesto está formando parte de la propia estructura del hueso, y que se necesitan tratamientos muy severos para poder solubilizarlo.

El alto valor del hidroxitirosol justifica de por sí el empleo de la autohidrólisis, aunque lleva sobreadicionado el aprovechamiento de los restantes productos obtenidos en el proceso (manitol, hemicelulosas muy ricas en xilosa, celulosa microcristalina, lignina, etc), algunos de ellos objeto de otra patente.

Explicación detallada

Figura 1: Esquema de fraccionamiento de hueso de aceitunas tras la explosión al vapor, donde A=Hueso de aceitunas; 1=Explosión al vapor, 2=Fracción soluble; 3=Fracción insoluble; 4=Solución acuosa; 5=Residuo; 6=Acetato de Etilo; 7=Hemicelulosas; B=Fenoles

Ejemplo de realización de la invención

a) *Proceso y condiciones de la autohidrólisis.*

A 100 g de hueso seco se añaden 2 L de una solución al 0,1 % de H_2SO_4 , se elimina el aire mediante vacío y se mantienen en contacto 1 hora, se filtran y lavan con agua hasta eliminar los restos de ácido. La muestra se introduce en el reactor, se programan tiempo y temperatura (2 min., 220 a 236°C), y se realiza la explosión por inyección de vapor de agua a presión, seguida de descompresión explosiva, y se re-

coge el material desfibrilado del depósito de expansión, con ayuda de la menor cantidad posible de agua. Se obtienen así una fracción soluble y otra insoluble. Esta última se extrae con agua (3 x 500 mL), a 60°C, durante 30 min., y los filtrados se unen a la fracción soluble.

b) *Identificación y cuantificación de hidroxitirosol*

La fracción soluble, que contiene la mayor parte de hemicelulosas y los fenoles de bajo peso molecular, se trata con acetato de etilo, a reflujo en un extractor líquido-líquido, durante 5 horas, para extraer los fenoles. A partir de este extracto, se identifican por HPLC los fenoles constituyentes. El mayoritario es el hidroxitirosol, cuya cantidad aumenta con la severidad del tratamiento, llegándose a cuantificar 105 mg/100 g de huesos de aceitunas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol a partir de huesos de aceituna, **caracterizado** porque el hueso de aceituna se somete a un proceso de autohidrólisis en un reactor que además del reactor propiamente dicho consta de una caldera de alimentación de vapor de agua y de un depósito donde se expande el material explosionado.

2. Procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** porque el hueso de la aceituna, sin triturar, se le impregna con ácido sulfúrico di-

luido, previamente a su introducción en el reactor y se le somete a altas temperaturas del orden de 200 a 235°C, durante un corto periodo de tiempo en torno a los 2 minutos y se lleva de nuevo a presión normal de manera que ocurra una descompresión explosiva.

3. Procedimiento según reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque después de realizado el tratamiento al vapor se lleva a cabo en fraccionamiento del material explotado para separar los principales constituyentes por solubilización selectiva, entre ellos el hidroxitirosol.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 145 701
⑫ N.º solicitud: 009800668
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 30.03.1998
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C07C 39/07, B09B 3/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | VLASENKO, E.Y. et al.: "Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw", 1997, Bioresource Technology, Vol. 59, páginas 109-119. Página 110: "Methods: Pretreatment". | 1-3 |
| A | DUFF, S.J.B. et al.: "Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review", 1996, Bioresource Technology, Vol. 55, páginas 1-33. Página 5, 2º párrafo a página 6, 2º párrafo. | 1-3 |
| A | ES 2051238 B1 (INGENIERIA Y DESARROLLO AGRO INDUSTRIAL, S.A.) 01.06.1994, todo el documento. | 1-3 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

| | | |
|--|------------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe 24.05.2000 | Examinador A. Maquedano Herrero | Página 1/1 |
|--|------------------------------------|---------------|